

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152068

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

探针熔解曲线分析技术
用于 PIK3CA 基因突变检测

Detection of PIK3CA Mutations with
Probe Melting Curve Analysis Technology

刘 歆

指导教师姓名: 李庆阁教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012 年 05 月

论文答辩时间: 2012 年 06 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人：_____

2012 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要	1
英文摘要	2
第一章 绪论	4
第一节 PI3K/AKT 信号通路概述	4
第二节 PIK3CA 基因突变及其意义概述	6
2.1 PIK3CA 基因突变及其分子生物学意义	6
2.2 PIK3CA 基因突变的临床意义	7
第三节 PIK3CA 基因突变的检测方法	10
参考文献	13
第二章 改良分子信标探针熔解曲线分析方法用于 PIK3CA 基因突变检测	18
第一节 引言	18
第二节 材料与方法	20
2.1 细胞株及临床样本来源	20
2.2 基因组 DNA 的提取	20
2.3 突变及野生质粒的构建	20
2.4 引物探针的设计	22
2.5 改良分子信标探针与人工合成靶序列的熔解曲线	25
2.6 两管改良分子信标熔解曲线分析检测体系的建立	27
2.7 体系分析性能评估	27
2.8 临床标本检测	29
第三节 结果与分析	29
3.1 构建质粒测序验证结果	29
3.2 靶序列探针熔解曲线分析考察改良分子信标效果	30

3.3 体系的优化与建立	32
3.4 体系分析性能评估	33
3.5 标本检测结果	39
3.6 标本测序结果	39
第四节 讨论	40
参考文献	43
第三章 ARMS 探针熔解曲线分析法检测 PIK3CA 基因热点突变	45
第一节 引言	45
第二节 材料方法	46
2.1 ARMS 引物的设计	46
2.2 两管单重单色 ARMS 熔解曲线分析检测体系的建立	48
2.3 两管单重单色 ARMS 检测体系的分析性能评估	48
2.4 临床标本检测	49
2.5 单管多重双色 ARMS 检测体系的建立	49
2.6 单管多重双色 ARMS 检测体系的分析性能评估	50
2.7 临床标本检测	50
第三节 结果与分析	51
3.1 两管单重单色 ARMS 检测体系的建立	51
3.2 两管单重单色 ARMS 体系分析性能评估	52
3.3 标本检测	54
3.4 单管多重双色 ARMS 体系的优化与建立	55
3.5 多重体系的分析性能评估	56
3.6 标本检测	59
第四节 讨论	61
参考文献	63

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	1
Abstract (In English)	2
Chapter I Introduction	4
Section I Overview of PI3K/AKT signal pathway	4
Section II PIK3CA gene mutations and their significance	6
2.1 PIK3CA gene mutations and their molecular biological significance	6
2.2 Clinical significance of PIK3CA gene mutations	7
Section III Detection methods of PIK3CA gene mutations	10
References	13
Chapter II Detection of PIK3CA gene mutations with stem-shared molecular beacons melting curve analysis	18
Section I Introduction	18
Section II Materials and methods	20
2.1 Cell lines and clinical samples	20
2.2 Extraction of genome DNA	20
2.3 Construction of plasmids	20
2.4 Design of primers and probes	22
2.5 Melting curve analysis with stem-shared beacons and targets	25
2.6 Establishment of 2 tubes real-time PCR assay with melting curve analysis	27
2.7 Evaluation of analysis capabilities of the detection systems	27
2.8 Detection of clinical samples	29
Section III Results	29
3.1 Sequencing results of constructed plasmid	29
3.2 Results of melting curve analysis with stem-shared beacons and targets	30

3.3 Optimization of the detection systems.....	32
3.4 Evaluation of the detection systems.....	33
3.5 Results of the clinical samples detection	39
3.6 Sequencing of the clinical samples	39
Section IV Discussion.....	40
References.....	43
 Chapter III Combined ARMS-PCR and probe melting curve analysis for detecting PIK3CA gene mutations	 45
Section I Introduction	45
Section II Materials and methods	46
2.1 Design of the ARMS primers	46
2.2 Establishment of uniplex ARMS detection systems.....	48
2.3 Evaluation of analysis capabilities of the uniplex ARMS detection systems.....	48
2.4 Detection of clinical samples.....	49
2.5 Establishment of multiplex ARMS detection systems	49
2.6 Evaluation of analysis capabilities of the multiplex ARMS detection systems	50
2.7 Detection of clinical samples.....	50
Section III Results.....	51
3.1 Establishment of uniplex ARMS detection systems	51
3.2 Evaluation of analysis capabilities of the uniplex ARMS detection systems.....	52
3.3 Results of the clinical samples detection	54
3.4 Optimization of the multiplex ARMS detection systems	55
3.5 Evaluation of analysis capabilities of the multiplex ARMS detection systems....	56
3.6 Results of the clinical samples detection	59
Section IV Discussion.....	61
References.....	63

摘要

磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K)是细胞信号通路中一大类脂激酶家族, PI3K/AKT 信号通路的活化在很多类型的肿瘤中都会导致异常的细胞增生。PIK3CA 基因编码 I A 类 PI3K 催化亚基 p110 α , 研究发现它在多种人类肿瘤中发生功能性突变, 导致 PI3K 激酶活性增加, 进而导致整个信号通路活化, 因此 PIK3CA 基因突变被认为在肿瘤治疗中有预测预后功能, 并可以作为药物开发的靶点。随着越来越多 PI3K 信号通路靶向抑制剂的开发, 对于 PIK3CA 基因突变的检测变得越来越重要。本研究利用分子生物学的方法, 基于实时 PCR 平台建立检测体系检测 PIK3CA 基因外显子 9 及外显子 20 上的突变, 为 PIK3CA 基因突变的检测提供新策略。

第一章, 首先介绍了 PI3K/AKT 信号通路在肿瘤发生发展中的作用, 随后介绍了 PIK3CA 基因以及其突变的分子生物学意义和临床意义, 最后介绍了 PIK3CA 基因突变的检测方法并提出了本研究所开发的两种新策略。

第二章, 介绍了改良分子信标探针熔解曲线分析方法的建立, 该方法相较于直接测序法提高了突变检测灵敏度, 对于 PIK3CA 基因突变的检测较全面, 且具有快速, 简便, 易于实现高通量检测的特点, 并且避免了 22q11.2 同源基因 (98%) 的扩增使得检测更准确。本检测体系对于突变 DNA 的选择性可达 5%~10%, 灵敏度可达 30 拷贝/反应, 体系特异性及重复性良好。在对 122 份肿瘤组织标本检测中结直肠癌标本检出突变 8 份 (8/94, 8.5%), 乳腺癌标本检出突变 11 份 (11/28, 39.3%), 测序验证中除 3 份突变标本测序为野生外其余均与测序结果一致, 说明本检测方法较测序更为灵敏。

第三章, 针对 3 个热点突变建立单管多重 ARMS 探针熔解曲线分析方法, 该方法的特异性 ARMS 引物对突变起到富集作用, 提高了野生背景下的突变检测灵敏度, 与前章所介绍的方法相互补充, 相互验证。本体系对于突变 DNA 的选择性可达 0.5%, 灵敏度可达 30 拷贝/反应, 体系特异性及重复性良好。在对 122 份肿瘤组织标本检测中结直肠癌中检出热点突变 8 份 (8/94, 8.5%), 乳腺癌中检出热点突变 10 份 (10/28, 35.7%), 测序验证中除 5 份突变标本测序为野生外其余均与测序结果一致, 且此 5 份中的 3 份为普通体系检出突变而测序野生的标本, 显示了 ARMS 体系突变检测更为灵敏的优点。

关键词: PIK3CA 突变; 熔解曲线分析; 扩增阻碍突变系统

ABSTRACT

Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) are a large family of lipid kinases involved in cell signaling. The activation of the PI3K/AKT pathway in a number of tumor types causes abnormalities in cell growth and proliferation. Mutations in the PIK3CA gene which encodes the p110 α catalytic subunit of the class I A PI3K have been reported in many types of cancers. The presence of the PIK3CA gene mutations which are functional active may cause up-regulation of the PI3K/AKT signaling pathway, making it a potentially useful therapeutic target and having prognostic values, so the detection of PIK3CA gene mutations is of great importance. This study describes two new strategies based on real-time PCR technology for the detection of the mutations in exon9 and exon20 of PIK3CA gene.

In the first chapter, first of all is the description of PI3K/AKT cell signaling pathway and its function in tumor; then described the molecular biology significance and clinical significance of PIK3CA gene mutations; in the end, showed the mutations detection technologies and the strategies developed in this study.

In the second chapter, the stem-shared molecular beacons melting curve analysis is established for the detection of the mutations in exon9 and exon20 of PIK3CA gene. Compared with sequencing, probe melting curve analysis has a better selectivity. The detection systems are capable of detecting more than 90% mutations in exon9 and exon20 without homologous gene interference. The detection systems can detect approximately 5%-10% mutant in a background of genomic DNA, they are capable of detecting as little as 30 copies DNA per reaction, and the specificity and repeatability of the systems is very well. In the detection of 122 clinical tumor frozen tissue samples 8 mutations (8/94, 8.5%) in Colorectal Cancer (CRC) and 11 mutations (11/28, 39.3%) in Breast Cancer (BC) were detected. Except 3 mutant samples were missed in sequencing, the detection results are in agreement with it, shows that the melting curve analysis is more sensitive than sequencing.

In the third chapter, the amplification refractory mutation system (ARMS) combine with the probe melting curve analysis is established for the detection of the 3 hotspot mutations of

PIK3CA gene. ARMS-PCR has the ability to enrich specific mutations based on the specific primers, so it can improve the selectivity of the system. Both the ARMS system and the system described in the last chapter have benefits, they confirm and complement by each other. The detection systems can detect approximately 0.5% mutant in a background of genomic DNA, it is capable of detecting as little as 30 copies DNA per reaction, and the specificity and repeatability of the system is very well. In the detection of 122 clinical tumor frozen tissue samples 8 hotspot mutations (8/94, 8.5%) in Colorectal Cancer (CRC) and 10 hotspot mutations (10/28, 35.7%) in Breast Cancer (BC) were detected. Except 5 mutant samples were missed in sequencing, the detection results are in agreement with it, and 3 of the 5 samples were confirmed by the normal primer systems, that shows the Superiority of the ARMS system.

Key Words: PIK3CA Mutations; Melting curve analysis; Amplification Refractory Mutation System.

第一章 绪论

第一节 PI3K/AKT 信号通路概述

在肿瘤的形成过程中,肿瘤细胞获得了一系列表型特征,使得它们可以快速而且无限制地增殖,侵袭周围的组织,适应新的环境,最后转移至其他组织。这往往是由于遗传基因的不稳定性,导致癌基因的上调和抑癌基因的下调造成的。之前,关于肿瘤信号通路的研究主要以 RAS 为重点^[1]。对 RAS 蛋白的上游和下游信号途径所进行的生化和遗传学研究,促使了受体酪氨酸激酶(Receptor tyrosine kinases, RTKs)引起的促有丝分裂信号 RAS/MAPK 通路的发现^[2-4]。近年来,随着对肿瘤相关基因的深入研究,另一个与肿瘤发生密切相关的信号通路,磷脂酰肌醇 3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K) 和 AKT 通路^[5-9] (图 1.1),逐渐引起了人们的重视。该信号通路在调节细胞的生长和增殖方面起着与 RAS/MAPK 同等重要的作用^[10]。PI3K 和 AKT 能磷酸化并调控许多与细胞代谢、凋亡、增殖和分化有关的蛋白,进而能抑制细胞的凋亡并促进肿瘤的生长^[11],以 PI3K/AKT 途径为靶标的基因治疗途径也在不断发展^[12-15]。

磷脂酰肌醇 3-激酶是由脂类激酶组成的能够特异性磷酸化肌醇磷脂 3 位羟基的一类激酶,称为 PI3Ks 家族,最早由 C.L.Cantley 研究组报道^[11]。该家族由 class I, class II, class III 3 类异构体组成, I 类 PI3Ks 根据功能和结构又进一步分为 I A 和 I B 两个亚类,其中 I A 类 PI3Ks 参与肿瘤的发生。I A 类 PI3K 由 p110 催化亚基和 p85 接头调节亚基组成,静止的细胞中催化亚基与调节亚基以异二聚体的形式存在,生长因子刺激激活其上游信号通路后调节亚基的 SH2 区与受体型酪氨酸激酶 (RTKs) 结合,解除对 p110 催化亚基的抑制作用,从而使得催化亚基活化,进而使细胞膜上的 PI (4,5) P2 磷酸化生成 PI (3,4,5) P3,而 PIP3 作为细胞内第二信使募集含有 PH 功能域的信号蛋白如 AKT 到达细胞膜,并使其被磷酸化激活,从而与下游的靶蛋白作用调控细胞生长、增殖、迁移等功能^[16,17],而 PIK3CA 正是编码 I A 类 PI3Ks 催化亚基 p110 α 的基因。

PIK3CA 基因是由 volinia 等^[18]于 1994 年利用原位杂交技术检测到的,定位于 3q26.3,长 34kb,包含 20 个外显子,编码 1068 种氨基酸,该组氨基酸产生一组长 124KD 的蛋白。在 PI3K/AKT 信号通路中,PIP3 可以在 PTEN 蛋白的作用下脱去一个磷酸转

变回 PI(4,5)P₂, PTEN 基因在调节 PI3K/AKT 信号通路中具有重要的作用^[19], 而 PIK3CA 基因则是 PI3K/AKT 信号通路的关键成员^[20, 21]。

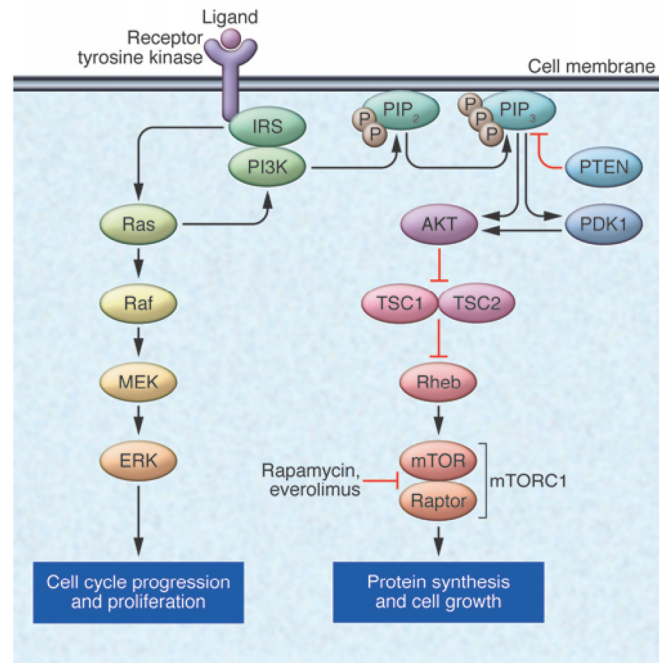


图 1.1 RAS/MAPK 以及 PI3K/AKT 信号通路^[9]

Figure 1.1 RAS/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathway^[9]

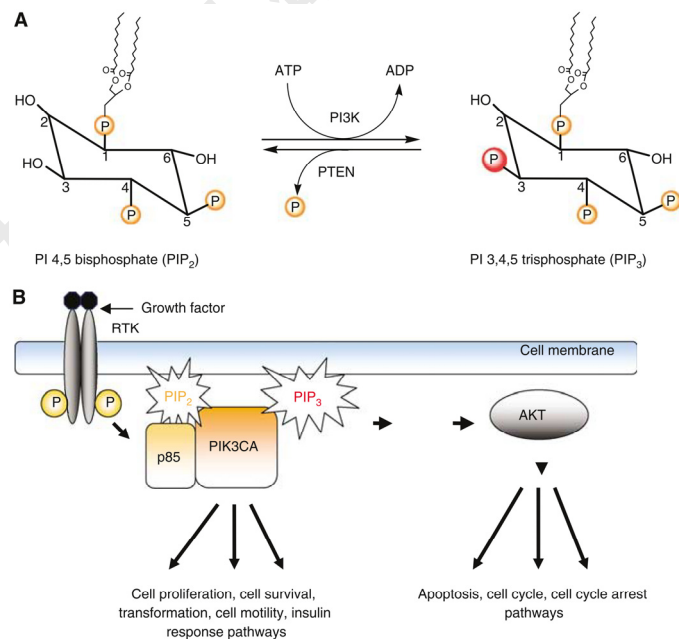


图 1.2 PI3K 的主要作用机制^[17]

Figure 1.2 The main reaction catalysed by PI3K^[17]

第二节 PIK3CA 基因突变及其意义概述

2.1 PIK3CA 基因突变及其分子生物学意义

Samuels 等^[22]筛查了结直肠癌中 PI3K 家族的 16 种成员的基因突变,其中编码 p110 α 催化亚基的 PIK3CA 基因是唯一发现存在实体瘤突变的基因。他们对 199 份结直肠癌患者 PIK3CA 所有外显子上的基因进行测序,发现突变率高达 32% (74/199),随后在恶性胶质细胞瘤中检出 PIK3CA 基因突变率为 27% (4/15),胃癌中 25% (3/12),乳腺癌中 8% (1/12),肺癌中 4% (1/24)。而近来也有多篇报道指出 PIK3CA 基因在包括结肠癌^[23]、卵巢癌和乳腺癌^[24]、胃癌^[25]、肝癌^[26]等多种肿瘤细胞中发生高频的体细胞突变 (20%~40%),这种在癌细胞中大量的突变提示其在功能上的重要意义。研究表明, p110 α 蛋白存在 5 个结构域,N 端的受体结合结构域称为 ABD(adaptor-binding domain),催化亚基靠其与 p85 调节亚基结合; Ras 结合结构域 RBD(Ras-binding domain); C2 结构域,有报道其与细胞膜结合;螺旋结构域以及激酶结构域(图 1.3)^[27]。实体瘤突变在 ABD、C2、螺旋及激酶结构域中均有发现,而在 p85 α 调节亚单位结合区,尤其是与催化活性有关的螺旋以及激酶结构域发生率尤其高,几乎所有突变都集中在此,提示了这种非随机高频突变与 PI3K 蛋白活性的相关性^[22]。其中位于螺旋结构域外显子 9 上的 Glu⁵⁴² 和 Glu⁵⁴⁵ 位点以及位于激酶结构域外显子 20 上的 His¹⁰⁴⁷ 突变频率最高,被称为热点突变(Hotspot Mutations),占据了所有 PIK3CA 基因突变的 80%~90%。已有大量研究表明,发生这 3 个热点突变的突变体 PI3K 的激酶活性会增加^[22, 28]。T Ikenoue 等^[29]研究了 36 种已报道的 PIK3CA 基因突变中的 8 种,分别是 p85 结合区的 R38H 和 G106V 突变, C2 区的 C420R 和 E453Q 突变,螺旋区的 E542K 和 E545K 突变,以及激酶区的 M1043I 和 H1047R 突变,结果表明这些突变均可以增加 PI3K 的激酶活性,表明它们其实是功能性突变。而其中热点突变 E542K、E545K 和 H1047R 的突变体都表现出了相当高的激酶活性。他们的研究同时也表明在 RBD 的点突变 K227E 可以提高 PI3K 的基础激酶活性,这说明了 RBD 对于 PI3K 催化活性有直接影响,但是在人类肿瘤中并没有发现有 RBD 突变。而存在于 p85 结合区和 C2 区的突变也只占了所有突变中的一小部分(<15%)。一旦 PIK3CA 基因发生了可以增加激酶活性的突变就会导致细胞致癌转化,使得下游的 AKT 信号通路受到正调控,诱导 AKT 和 p10S6K 活化,使细胞不断生长增

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库